

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 e-ASIA 共同研究プログラム

(英語) International Collaborative Research Program The e-ASIA Joint Research Program (e-ASIA JRP)

研究開発課題名：(日本語) 染色体性薬剤耐性遺伝子を保持する薬剤耐性菌の分子疫学的解析

(英語) Characterization of multidrug resistance Gram-negative bacteria carrying antibiotics-resistance gene which have been inserted to chromosome.

研究開発担当者 (日本語) 琉球大学医学部保健学科 教授 平井 到

所属 役職 氏名：(英語) School of Health Sciences, Faculty of Medicine,
University of the Ryukyus Professor Itaru Hirai, Ph.D

実施期間：平成28年8月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 染色体性薬剤耐性遺伝子の分子疫学的解析

開発課題名：(英語) Characterization of antibiotics-resistance gene which have been inserted to chromosome.

研究開発分担者 (日本語) 琉球大学医学部保健学科 教授 平井 到

所属 役職 氏名：(英語) School of Health Sciences, Faculty of Medicine,
University of the Ryukyus Professor Itaru Hirai, Ph.D

分担研究 (日本語) 臨床分離株における薬剤耐性菌に関する解析

開発課題名：(英語) Genetic analysis of the clinical isolates of the drug resistant bacteria.

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科

所属 役職 氏名： 教授・白川 利朗
(英語) Kobe University Graduate School of Science, Technology and Innovation, Professor: Toshiro Shirakawa MD, PhD

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では日本、ベトナム、インドネシアにおける健常人由来薬剤耐性菌、医療関連施設において分離される薬剤耐性臨床分離株を用い、通常薬剤耐性プラスミド上に保持される薬剤耐性遺伝子が染色体に転移した染色体性薬剤耐性遺伝子を効率的に検出する新たな検出法の確立を行う。また、確立した方法を用いて染色体性薬剤耐性遺伝子を保持する薬剤耐性菌の性状を解析しコミュニティ及び医療関連施設における薬剤耐性菌の拡散伝播メカニズムについて検討する。

この目的を達成するために、本年度は2016年8月（琉球大学より1名、神戸大学より1名の研究者が渡航）及び2017年1月（琉球大学より1名の研究者が渡航）に研究打合せのためにインドネシア・アイルランガ大学を訪問し、インドネシア側研究代表者 Kuntaman 教授と面談を行い、2016年11月にキックオフミーティングをインドネシア・アイルランガ大学において行った（参加者日本、インドネシア側研究者併せて9名うち3名が琉球大学より渡航、1名が神戸大学より渡航、ベトナム側研究者は所用により欠席となった）。

本年度は以下の点を研究開発項目とした。項目ごとに本年度の研究活動の概要をまとめる。

i) 染色体性薬剤耐性遺伝子の効率の良い検出法の確立

ベトナム人健常人より分離された *bla*_{CTX-M} を保持する大腸菌株から抽出した DNA を材料とし、染色体性薬剤耐性遺伝子の効率の良い検出法の確立を試みた。PCR 法に代表されるいくつかの遺伝子増幅・解析法及び次世代シーケンサーによる解析を行うこととした。次年度は実際に次世代シーケンサーにより解析を行い、修正等が必要か否か検討する。

ii) 日本、ベトナム、インドネシアの臨床分離株における染色体性薬剤耐性遺伝子の検出頻度

日本で分離されている臨床分離菌株のうち、91株の CTX-M 型基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生菌について染色体性薬剤耐性遺伝子の検出を行った。その結果、81株の CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌のうち22株に染色体性薬剤耐性遺伝子が観察された。また、医療機関において同じ位置に染色体性薬剤耐性遺伝子を保持する CTX-M 型 ESBL 産生大腸菌が比較的長期間（約1年間）検出されることが明らかとなった。ベトナムにおいてはベトナム側研究者と協働での医療施設に臨床分離株の分与依頼をするか等詳細を検討中である。インドネシアにおいては、尿路感染患者検体から307株の ESBL 産生大腸菌株を分離しており、解析を進めている。

iii) 日本、ベトナム、インドネシアの健常人における染色体性薬剤耐性遺伝子の検出頻度

沖縄県の地域住民における薬剤耐性菌の保菌率と同薬剤耐性菌が保持する染色体性薬剤耐性遺伝子の実態を明らかにするために、研究代表者の所属する琉球大学の倫理委員会に研究計画書を提出し承認をすでに得ている。インドネシアの健常人に関する研究については、現在神戸大学及びアイルランガ大学において研究計画書を作成し倫理委員会への申請を進めている。

In this project, we analyze chromosomally-transferred antimicrobial resistant (AMR) genes in isolates obtained from asymptomatic health individuals and clinics in Japan, Vietnam and Indonesia by conventional molecular microbiological methods and establishing new protocol(s) for the chromosomally-transferred AMR genes. Especially, this project works to explain roles of the chromosomally-transferred AMR genes in distribution of AMR bacteria internationally.

This year period, Japanese researchers visited to the Airlangga University, Indonesia in August, 2016 and January, 2017 for research communication and November, 2016 for a kick-off meeting for this international collaboration.

Research activities in this project are summarized as follows.

i) Establishing new protocol for detection of the chromosomally-transferred AMR genes

We are establishing new detection protocol(s) for the chromosomally-transferred AMR genes by PCR and other gene amplification methods combined with the next generation sequencing with already established AMR bacteria. In the following budgetary year, this methods is evaluated precisely by the next generation sequencer.

ii) Prevalence of the chromosomally-transferred AMR genes in AMR bacteria obtained from clinics in Japan, Vietnam and Indonesia.

By using already isolated clinical isolated from a Japanese hospital, prevalence of the chromosomally-transferred AMR gene, *i.e.* *bla*_{CTX-M}, was evaluated. Consequently, 22 of 81 examined *Escherichia coli* isolates-producing extended spectrum β -lactamase (ESBL) possessed the chromosomally-transferred *bla*_{CTX-M}. Certain *E. coli* isolates which possessed the chromosomally-transferred *bla*_{CTX-M} in the same chromosomal inserted region were detected approximately for one year in a hospital in Japan. For further analysis, researchers in this project is communicating with Vietnamese clinic for obtaining AMR bacteria in Vietnam. Meanwhile, already 307 uropathogenic *E. coli* isolates-producing ESBL have been collected from patients of the Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia. These isolates are subjected to the analysis.

iii) Prevalence of the chromosomally-transferred AMR genes in AMR bacteria obtained from community in Japan, Vietnam and Indonesia.

For collecting sample from community in Japan, a research proposal has been approved by the ethics committee in the University of the Ryukyus. In addition, another research proposals are prepared and to be submitted to the ethics committees in the Kobe University and the Airlangga University for collecting sample from Indonesian community.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌3件）

1. HOANG TA, NGUYEN TN, UEDA S, LE QP, TRAN TT, NGUYEN TN, DAO TV, TRAN MT, LE TT, LE TL, NAKAYAMA T, HIRAI I, DO TH, VIEN QM, YAMAMOTO Y., Common findings of *bla*_{CTX-M-55}-encoding 104-139 kbp plasmids harbored by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in pork meat, wholesale market workers, and patients with urinary tract infection in Vietnam., *Curr Microbiol.* 2017, 74(2):203-211.
2. Wasito EB, Shigemura K, Osawa K, Fardah A, Kanaida A, Raharjo D, Kuntaman K, Hadi U, Harijono S, Sudarmo SM, Nakamura T, Shibayama K, Fujisawa M, Shirakawa T. Antibiotic susceptibilities and genetic characterization of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from stools of pediatric diarrhea patients in Surabaya, Indonesia. *Jpn J Infect Dis.* 2016 Dec 22. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.234.
3. Ijima Y, Oundo JO, Hibino T, Saidi SM, Hinenoya A, Osawa K, Shirakawa T, Osawa R, Yamasaki S. High Prevalence of Diarrheagenic *Escherichia coli* among Children with Diarrhea in Kenya. *Jpn J Infect Dis.* 2017 Jan 24;70(1):80-83. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.064.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Insertion sequence による薬剤耐性遺伝子の染色体への転移、口頭、平井 到、浜元宏太、第 90 回日本細菌学会総会、仙台市、2017 年 3 月 19–21 日、国内
2. 染色体性 *bla*_{CTX-M} を保有する臨床分離大腸菌の長期検出とその意義、ポスター、浜元宏太、平井 到、第 90 回日本細菌学会総会、仙台市、2017 年 3 月 19–21 日、国内
3. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in Indonesia. ポスター、Akiho Kanaida, Kayo Osawa, Katsumi Shigemura, Alpha Fardah, Dadik Raharjo, Eddy Bagus Wasito, Sugeng Harijono, Subijanto Marto Sudarmo, Toshiro Shirakawa. 第 32 回世界医学検査学会 (神戸)、2016/8/31~2016/9/4、国内
4. インドネシアで分離された *Vibrio cholerae* の疫学解析、山中 凌、大澤 佳代、重村克巳、木下承皓、Alpha Fardah、Dadik Raharjo、Eddy Bagus Wasito、Sugeng Harijono、Subijanto Marto Sudarmo、白川利朗、ポスター、第 11 回日本臨床検査学教育学会学術大会 (神戸)、2016/8/31~2016/9/1、国内
5. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated urinary tract infection in a university teaching hospital、ポスター、Katsumi Shigemura、Kayo Osawa、Kazushi Tanaka、Yuzo Nakano、Toshiro Shirakawa、Soichi Arakawa、Masato Fujisawa、111th AUA annual meeting (CA,USA) ,2016/5/6~2016/5/10、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 e-ASIA 共同研究プログラム

(英語) International Collaborative Research Program The e-ASIA Joint Research Program (e-ASIA JRP)

研究開発課題名：(日本語) 臨床分離株における薬剤耐性菌に関する解析

(英語) Genetic analysis of the clinical isolates of the drug resistant bacteria.

研究開発分担者 (日本語) 琉球大学医学部保健学科 教授・白川 利朗

所属 役職 氏名：(英語) Kobe University Graduate School of Science, Technology and Innovation, Professor: Toshiro Shirakawa MD, PhD

実施期間：平成28年 8月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：琉球大学・医学部保健学科・平井 到 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0件、国際誌 2件)

1. Wasito EB, Shigemura K, Osawa K, Fardah A, Kanaida A, Raharjo D, Kuntaman K, Hadi U, Harijono S, Sudarmo SM, Nakamura T, Shibayama K, Fujisawa M, Shirakawa T. Antibiotic susceptibilities and genetic characterization of extended spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli isolated from stools of pediatric diarrhea patients in Surabaya, Indonesia. Jpn J Infect Dis. 2016 Dec 22. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.234.
2. Ijima Y, Oundo JO, Hibino T, Saidi SM, Hinenoya A, Osawa K, Shirakawa T, Osawa R, Yamasaki S. High Prevalence of Diarrheagenic Escherichia coli among Children with Diarrhea in Kenya. Jpn J Infect Dis. 2017 Jan 24;70(1):80-83. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.064.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in Indonesia. ポスター、Akiho Kanaida, Kayo Osawa, Katsumi Shigemura, Alpha Fardah, Dadik Raharjo, Eddy Bagus Wasito, Sugeng Harijono, Subijanto Marto Sudarmo, Toshiro Shirakawa. 第32回世界医学検査学会（神戸）、2016/8/31～2016/9/4、国内
2. インドネシアで分離された *Vibrio cholerae* の疫学解析、山中 凌、大澤 佳代、重村克巳、木下承皓、Alpha Fardah、Dadik Raharjo、Eddy Bagus Wasito, Sugeng Harijono、Subijanto Marto Sudarmo、白川利朗、ポスター、第11回日本臨床検査学教育学会学術大会（神戸）、2016/8/31～2016/9/1、国内
3. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated urinary tract infection in a university teaching hospital、ポスター、Katsumi Shigemura, Kayo Osawa, Kazushi Tanaka, Yuzo Nakano, Toshiro Shirakawa, Soichi Arakawa, Masato Fujisawa、111th AUA annual meeting (CA,USA) ,2016/5/6～2016/5/10、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし